

26.12.03

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

JPO3/16858

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2003年 5月 7日

出 願 番 号  
Application Number: 特願2003-129208  
[ST. 10/C]: [JP2003-129208]

REC'D 19 FEB 2004	
WIPO	PCT

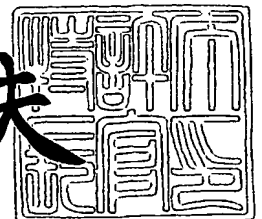
出 願 人  
Applicant(s): 財団法人化学及血清療法研究所

PRIORITY DOCUMENT  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年 2月 6日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今 井 康 夫



【書類名】 特許願

【整理番号】 JP443YS

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 A61K 37/54  
A61K 38/43  
C07K 14/47

【発明者】

【住所又は居所】 熊本県熊本市保田窪一丁目 2-134-508

【氏名】 岡嶋 研二

【発明者】

【住所又は居所】 熊本県菊池郡旭志村川辺四の西沖 1314-1 財団法人化学及血清療法研究所 菊池研究所内

【氏名】 須藤 博之

【発明者】

【住所又は居所】 熊本県菊池郡旭志村川辺四の西沖 1314-1 財団法人化学及血清療法研究所 菊池研究所内

【氏名】 松尾 富士男

【発明者】

【住所又は居所】 熊本県菊池郡旭志村川辺四の西沖 1314-1 財団法人化学及血清療法研究所 菊池研究所内

【氏名】 中垣 智弘

【特許出願人】

【識別番号】 000173555

【住所又は居所】 熊本県熊本市大窪一丁目 6 番 1 号

【氏名又は名称】 財団法人 化学及血清療法研究所

【代表者】 内野 矜自

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 056568

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】	明細書	1
【物件名】	図面	1
【物件名】	要約書	1
【プルーフの要否】	要	

【書類名】 明細書

【発明の名称】 悪性腫瘍に対する化学療法補助剤

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 活性化プロテイン C（以下、APC と称することがある）を主たる有効成分として含有することを特徴とする、悪性腫瘍治療における化学療法補助剤。

【請求項 2】 悪性腫瘍治療における化学療法剤の毒性を軽減し得る請求項 1 記載の化学療法補助剤。

【請求項 3】 悪性腫瘍患者の生命予後を改善し得る請求項 1 記載の化学療法補助剤。

【請求項 4】 悪性腫瘍治療における化学療法剤の補助剤であって、化学療法剤によって惹起される血栓形成性を軽減し得る請求項 1 から請求項 3 にいずれかに記載の化学療法補助剤。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【産業上の利用分野】

本願発明は、医療用医薬品の分野に関する。詳細には、血漿蛋白質の新たな用途に関する。さらに詳細には、活性化プロテイン C（以下、APC と称することがある）を主たる有効成分として含有する悪性腫瘍治療のための医薬品に関し、化学療法剤の毒性を軽減し、患者の生命予後を改善し得る化学療法補助剤に関する。

【0002】

【従来の技術並びに発明が解決しようとする課題】

白血病などの造血系の腫瘍から固型癌にいたるまで各種悪性腫瘍の治療に、多数の化学療法剤が使用されている。これらの化学療法剤には、i) 腫瘍細胞のみでなく正常細胞にも毒性を発揮する、ii) そのため種々の副作用が起こることが知られている。

これらの問題点を克服するため、以下に示すような多くの研究が展開されている（非特許文献 1 参照）。

## 【0003】

## a. 新しい化学療法剤の開発と投与法の工夫

従来の化学療法剤の誘導体を作るのではなく、レチノイドなどの遺伝子発現調節因子や、がん遺伝子産物や細胞内情報伝達系を標的とした薬物の開発が進められている。また、新しい概念の薬剤としてG<sub>1</sub>, G<sub>2</sub>期に特有の制御機構を標的とする細胞周期阻害剤の開発も試みられている（非特許文献2参照）。

しかし正常組織にまったく影響しない薬剤の開発はきわめて困難であるため、一方では化学療法剤を腫瘍細胞にできるだけ高濃度に作用させる方法、すなわち標的治療（ターゲッティング）も試みられている。もっとも簡単な方法は局所への注入や動脈内持続注入法であるが、その他、化学療法剤をマイクロカプセルに封入し選択的に動脈に注入して塞栓をする方法、後述するようにモノクローナル抗体と化学療法剤を結合させて投与するミサイル療法、化学療法剤を含んだりポソームとモノクローナル抗体を組み合わせる標的治療をする方法、化学療法剤を導入した温熱感受性リポソームと温熱療法を併用する方法、腫瘍細胞の受容体に結合する増殖因子に化学療法剤を結合させ投与する方法など、種々の工夫がなされている。しかしまだ確実によい方法は見出されていない。

## 【0004】

## b. 副作用の軽減

化学療法剤には多様な副作用があり、成因の不明なものも少なくない。薬剤の投与量を規定する重要な副作用は骨髄抑制であり、ほとんどの薬剤で白血球減少などの症状が起こる。これに対しては、白血球の造血に働くコロニー刺激因子（Colony-Stimulating Factor; CSF）が臨床に導入され、速やかに白血球を増加させることにより感染を防止することができるようになった。またシスプラチン、塩酸ドキソルビシンなど腎毒性、心毒性を有する薬剤に対しても、その代謝を変えることにより副作用の軽減が図られている。また化学療法剤のなかには重金属錯体、アルキル化剤等の、フリーラジカル産生物質が多いところから、これらの物質を結合除去する作用のあるメタロチオネインを誘導することにより、主作用に影響することなく副作用を軽減する方法についても研究が進められている（非特許文献3参照）。

## 【0005】

## c. 他の治療法との併用

化学療法の効果を上げるために、温熱療法、放射線療法、免疫療法との併用が試みられている。特に、殺細胞作用を有するインターフェロンやインターロイキン-2などのいわゆるbiological response modifier(BRM)との併用は作用機序も異なり副作用も重なり合わないことからその効果が期待されている。

## 【0006】

## d. 抗凝固剤の効果

血液凝固と悪性腫瘍の関連については広く研究されており、悪性腫瘍患者が血栓症を発症しやすいことは良く知られている(非特許文献4参照)。悪性腫瘍患者の60%が過凝固状態にあるとの報告や(非特許文献5参照)、その15%で血栓症の症状を示すとの報告(非特許文献6参照)もある。したがって、化学療法や放射線療法と抗凝固療法(ヘパリンやワルファリン)を組み合わせることにより、悪性腫瘍に対して高い効果が期待された(非特許文献7参照)。

実際、代表的抗凝固剤であるヘパリンは、既存の悪性腫瘍治療法にヘパリンを付加すると統計的に有意な延命効果があることが、各種レトロスペクティブな臨床研究(非特許文献8参照、非特許文献9参照、非特許文献10参照)やプロスペクティブな臨床研究(非特許文献11参照)から示されており、悪性腫瘍患者に対するヘパリンの有用性が示唆されている(非特許文献12参照)。また、APCが造血器悪性腫瘍に起因するDIC(播種性血管内凝固)患者の生命予後を改善することも示されている(特許文献1参照)。

一方、抗凝固剤の有用性とは逆に、凝固因子(活性化血液凝固第IX因子、凝固反応のトリガーとなる組織因子(凝固第III因子))を単独投与あるいはサイトカインと併用投与し凝固促進状態を誘発することにより抗腫瘍効果が示されとの特許(特許文献2参照)や、生体の主要な凝固制御機構であるプロテインC抗凝固系を阻害する因子を単独あるいは抗腫瘍剤と組み合わせて投与することで顕著な抗腫瘍効果を示すとの特許も報告されている(特許文献3参照)。

このように、近年、悪性腫瘍の化学療法は飛躍的な進歩を遂げているとはいえ、上述の問題点は十分に克服されておらず、悪性腫瘍に対する化学療法による治

療効果の更なる向上が切望されている。

【0007】

【特許文献1】

特願 2002-379409

【特許文献2】

特表平 10-501813

【特許文献3】

米国特許第 5147638

【非特許文献1】

がんの新しい診断と治療, 井村裕夫編

【非特許文献2】

Exp Cell Res, vol.177, p.122-131, 1988

【非特許文献3】

Toxicol Lett, vol.24, p.203-207, 1985

【非特許文献4】

Am J Hematol, vol.72, p.43-52, 2003

【非特許文献5】

Ann Clin Lab Sci, vol.24, p.1-5, 1994

【非特許文献6】

Semin Thromb Hemost, vol.18, p.373-379, 1992

【非特許文献7】

Haemostasis, vol.16, p.300-320, 1986

【非特許文献8】

Ann Intern Med, vol.96, p.561-565, 1982

【非特許文献9】

Int J Colorectal Dis, vol.8, p.111-115, 1993

【非特許文献10】

Surgery, vol.93, p.433-438, 1983

【非特許文献11】

Cancer, vol.74, p.38-45, 1994

【非特許文献 12】

Thromb Haemost, vol.80, p.10-23, 1998

【0008】

【課題を解決するための手段、発明の構成】

そこで、本願発明者らはこのような化学療法剤の問題点を軽減する効果を有する化学療法補助剤を見出すべく鋭意研究した結果、驚くべきことに、従来試みられることのなかった抗凝固薬のAPCに、悪性腫瘍患者に対する化学療法剤の治療効果を劇的に高める作用があること、また、既に悪性腫瘍患者に対する有用性が示されていたヘパリンに比べその効果は有意に高いことを見出し、これらの知見に基づいて本願発明を完成するに至った。なお、これらの知見は、APCとヘパリンを用いたDIC治療成績を、悪性腫瘍を基礎疾患とするDIC患者の治療について解析した結果に基づくものである。

【0009】

本願発明の悪性腫瘍に対する化学療法補助剤は、APCをその主たる有効成分とすることに特徴を有する。当該補助剤が補助する悪性腫瘍に対する化学療法剤は、例えば、エノシタビン、硫酸ビンクリスチン、シクロホスファミド、塩酸ダウノルビシン、シタラビン等の汎用的な薬剤が例示されるが、これらに限定されるものではなく、またこれら薬剤の多剤併用も本願発明の技術思想の範囲に含まれる。また、本願発明の化学療法補助剤の投与態様についても特段の制約はなく、例えば、化学療法剤投与開始前から、あるいは同時に投与されるのが好適な態様と考えられる。

【0010】

APCは血中ではその前駆体のプロテインC(PC)として血管内を循環している。一旦凝固系が作動しトロンビンが形成されると、トロンビンは、血管内皮細胞上の膜蛋白質のトロンボモジュリン(TM)に結合し、PCを活性化してセリンプロテアーゼ活性を有するAPCに変換する。APCは、細胞膜リン脂質上で、血液凝固系の活性化第V因子や活性化第VIII因子を選択的に限定分解し失活化させ、強力な抗凝固作用を発揮する(Biochemistry, vol.16, p.5824-5831, 1977

;J Biol Chem, vol.258, p.1914-1920, 1982)。このAPCによる抗凝固作用はコファクターのプロテインSが存在すると増強される。なおPC、TM、プロテインS等が関与する凝固制御機構をプロテインC抗凝固系という。

#### 【0011】

一方、APCは血管内皮細胞あるいは血小板由来の組織プラスミノゲン・アクチベーター・インヒビター (PAI) を中和することにより (Proc Natl Acad Sci USA, vol.82, p.1121-1125, 1985; J Biol Chem, vol.276, p.15567-15570, 2001)、また抗線溶因子のTAFI (Thrombin Activatable Fibrinolysis Inhibitor) の活性化を抑制することにより (Blood, vol.88, p.2093-2100, 1996)、線溶系の亢進に関与していると考えられている。

#### 【0012】

さらに、APCは敗血症モデルにおいても有効性が示されていること (J Clin Invest, vol.79, p.918-925, 1987)、また白血球からのサイトカイン産生を抑制する作用も有することから (Am J Physiol, p.L197-L202, 1997)、APCは抗炎症作用を有することが示唆されている。臨床的にもEli Lilly社が実施した重症敗血症患者を対象にした大規模臨床試験において、組換えAPC製剤投与により死亡率が有意に低下すること、また、炎症性サイトカインのIL-6レベルが投与一日目から有意に低下することが示された (N Engl J Med, vol.344, p699-709, 2001)。

#### 【0013】

本願発明の化学療法補助剤の本態でありこれに使用されるAPCを製造する方法は特に限定されるものではないが、例えばヒト血液より分離した、あるいは遺伝子組換え技術により得られたPCを活性化する方法、ヒト血液よりAPCを分離する方法、あるいは遺伝子組換え技術により直接APCを調製する方法などによって製造することができる。PCからAPCへの活性化の方法には特に制約はなく、例えばヒトやウシなどの血液より分離したトロンビンにより活性化する方法、あるいは組換えトロンビンにより活性化する方法などにより実施できる。

#### 【0014】

血液由来のAPCの製法としては、以下の方法が挙げられる。例えば、特許第

3043558号による方法、あるいは、ヒト血漿から抗PC抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより精製されたPCを、ヒトトロンビンで活性化した後、陽イオンクロマトグラフィーを用いて精製する方法 (Blood, vol.63, p.115-121, 1984)、Kisielによる、ヒト血漿からクエン酸Ba吸着・溶出、硫酸分画、DEAE-セファデックスカラムクロマトグラフィー、デキストラン硫酸アガロースクロマトグラフィー及びポリアクリルアミドゲル電気泳動の工程により精製して得られたPCを活性化してAPCとする方法 (J Clin Invest, vol.64, p.761-769, 1979)、市販のPCを含有する第IX因子複合体製剤を出発材料にして抗PC抗体を用いたアフィニティークロマトグラフィーにより精製されたPCを活性化してAPCとする方法 (J Clin Invest, vol.79, p.918-925, 1987) などがある。

また、遺伝子組換え技術を用いてAPCを調製する方法としては、例えば特開昭61-205487号、特開平1-002338号あるいは特開平1-085084号などに記載された方法などがある。

#### 【0015】

上述の方法で調製されたAPCの活性を最大限に維持するために、本願発明で使用するAPCは好適な安定化剤と共に凍結乾燥して保存する。本願発明では、有効成分としてのAPCと公知の適当な賦形剤を組み合わせ、公知の方法で本願発明の悪性腫瘍に対する化学療法剤の補助剤とすることが出来る。本願発明のAPCを本態とする化学療法補助剤の投与量については、患者の年齢、病態等により適宜変動し得るものであるが、例えば、300~900単位/kg/日の3~6日間の持続投与は好適な態様と考えられる。なお、APC活性の1単位は、正常血漿とAPCを含む測定試料とを同量混和したとき活性化部分トロンボエチン時間 (APTT) を2倍に延長する、測定試料1ml中に含まれる活性量である。

#### 【0016】

今回の実施例に使用した血液由来のAPCは、マウス及びイヌでの単回静脈内投与試験、マウス、イヌおよび幼若イヌでの反復静脈内投与試験、マウス生殖試験、局所刺激性試験、一般薬理試験 (ビーグル犬を用いた呼吸循環系に及ぼす

影響)、ウイルス不活化試験などによりその安全性が確認されている。

#### 【0017】

##### 【発明の効果】

本願発明によりもたらされた知見により、悪性腫瘍に対する従来の化学療法剤の副作用を軽減し、その薬効を増大させ患者の予後を顕著に改善し得る補助剤を提供する緒を拓いた。本願発明は、斯くも顕著な作用効果を発揮するものであり、斯界に貢献すること誠に多大な意義のある発明であると確信する。

#### 【0018】

以下に、実施例に従って本願発明を詳説するが、本願発明はこれら実施例に何等限定されるものではない。

#### 【0019】

##### 【実施例】

##### 実施例 1

(APC投与における悪性腫瘍患者の化学療法剤併用の影響)

悪性腫瘍を基礎疾患とするDICに対するAPCの有効性・安全性を検討するために第III相二重盲検比較試験(対照薬はヘパリン)を実施した(Int J Hematol, vol.75, p.540-547, 2002)。各製剤の投与量・投与方法は、1) APC(治験コード名:CTC-111); 300単位/kg/日の6日間投与、2) ヘパリン; 8単位/kg/時間の6日間投与とした。なお、ヘパリンの投与量8単位/kg/時間はDIC治療での標準的な投与量である。DICは種々の基礎疾患に起因して発症するが、基礎疾患が悪性腫瘍の患者について製剤投与終了1ヶ月後までの生存率を調べたところ、APC投与群が77.5%(31/40)であるのに対して、ヘパリン投与群では54.2%(26/48)であった。

#### 【0020】

化学療法剤併用の有無でAPCと対照薬ヘパリンを比較すると、化学療法剤が併用されているときAPCは死亡率を大きく軽減できることが示された。

すなわち、化学療法剤が併用されていない時の製剤投与終了1ヶ月後までの生存率は、APC投与群が52.6%(10/19)であるのに対して、ヘパリン投与群では38.1%(8/21)であり(表1参照)、Log-rank検定で両群間に有意

差は認められなかった ( $P=0.419$ ; 図1参照)。一方、化学療法剤が併用されている時の製剤投与終了1ヶ月後までの生存率は、APC投与群が100% (21/21) であるのに対して、ヘパリン投与群では66.7% (18/27) であり (表1参照)、APC投与群はヘパリン投与群に比べ有意に (Log-rank検定;  $P=0.004$ ) 生存率を改善した (図2参照)。

## 【0021】

【表1】

化学療法剤の併用無し		化学療法剤の併用有り	
APC投与群	ヘパリン投与群	APC投与群	ヘパリン投与群
10/19 (52.6%)	8/21 (38.1%)	21/21 (100%)	18/27 (66.7%)

## 【0022】

実施例2

(APC投与における悪性腫瘍患者の血栓症治療効果に及ぼす化学療法剤併用の影響)

凝固・線溶系の鋭敏なマーカーであるDダイマー、TAT (Thrombin-Antithrombin Complex)、FMテスト、PIC (Plasmin - Plasmin Inhibitor Complex) は、深部静脈血栓症 (DVT) や肺血栓塞栓症 (PE) 等の血栓症の診断や治療効果の判定に有用であることが知られている (Blood Coagul Fibrinolysis, vol.11, p.371-377, 2000)。これら4つのマーカーを表2に従ってスコア化し、その合計点の推移につき、製剤投与前と投与終了直後とを比較して、4段階に評価する (著明改善: 2点以上の改善、改善: 1点の改善、不変: 変化なし、悪化: 1点以上の悪化) ことにより (この評価をFMテスト等の総合評価と呼ぶ)、悪性腫瘍患者の血栓症治療効果に及ぼす化学療法剤併用の影響をAPCとヘパリンで比較した。なお、著明改善および改善を有効に、不変および悪化を無効とし評価した。

## 【0023】

【表 2】

検査項目	スコア		
	0	1	2
FM テスト	-	+	++, +++
D ダイマー (ng/mL)	< 1000	1000~4000	> 4000
TAT (ng/mL)	< 8	8~20	> 20
PIC ( $\mu$ g/mL)	< 2	2~5	> 5

## 【0024】

実施例 1 と同様に、基礎疾患が悪性腫瘍の DIC 患者について APC 投与群とヘパリン投与群とで、FM テスト等の総合評価により血栓形成防止効果を比較した。その結果を表 3 に示す。化学療法剤が併用されなかった時の APC とヘパリンの有効率の差は 9.7% であるのに対して、化学療法剤が併用された時、APC とヘパリンの有効率の差は 23.4% であった。統計的な有意差は示さなかったが、化学療法剤が併用された場合、特にヘパリンに比べ APC は高い有効性（抗血栓性）を示した。

## 【0025】

【表 3】

化学療法剤の併用なしでの有効率		化学療法剤の併用ありでの有効率	
APC 投与群	ヘパリン投与群	APC 投与群	ヘパリン投与群
10/19 (52.6%)	9/21 (42.9%)	13/21 (61.9%)	10/26 (38.5%)
P=0.7518		P=0.1468	

## 【図面の簡単な説明】

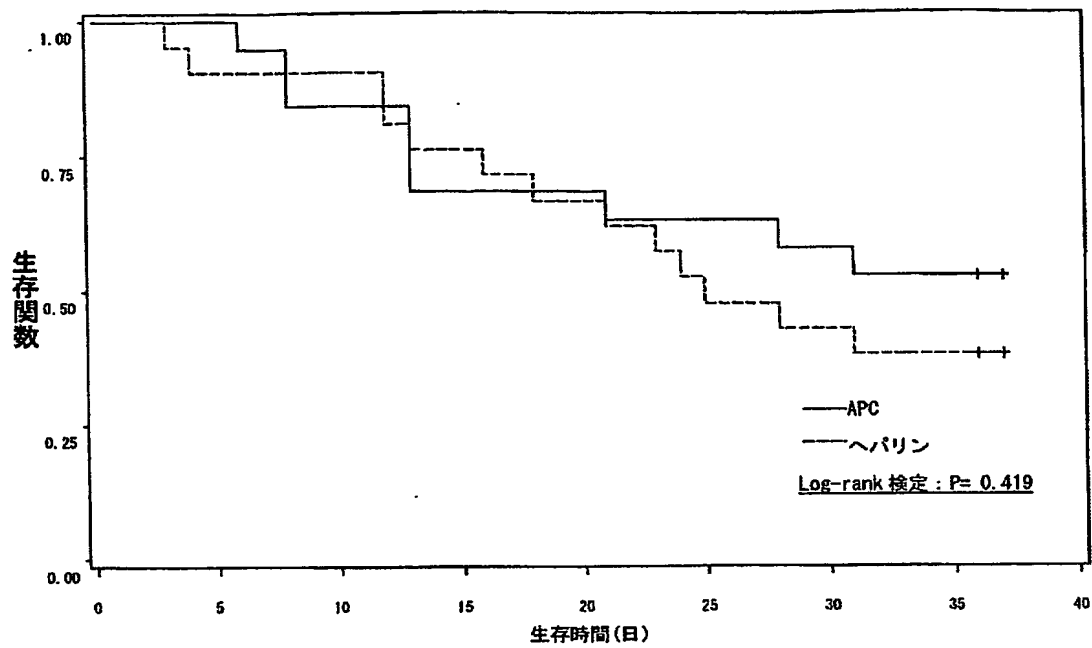
【図 1】 化学療法剤が併用されていないとき、APC と対照薬ヘパリンを投与した場合の悪性腫瘍患者の生存時間曲線解析を示した図である。

【図 2】 化学療法剤が併用されているとき、APC と対照薬ヘパリンを投与した場合の悪性腫瘍患者の生存時間曲線解析を示した図である。

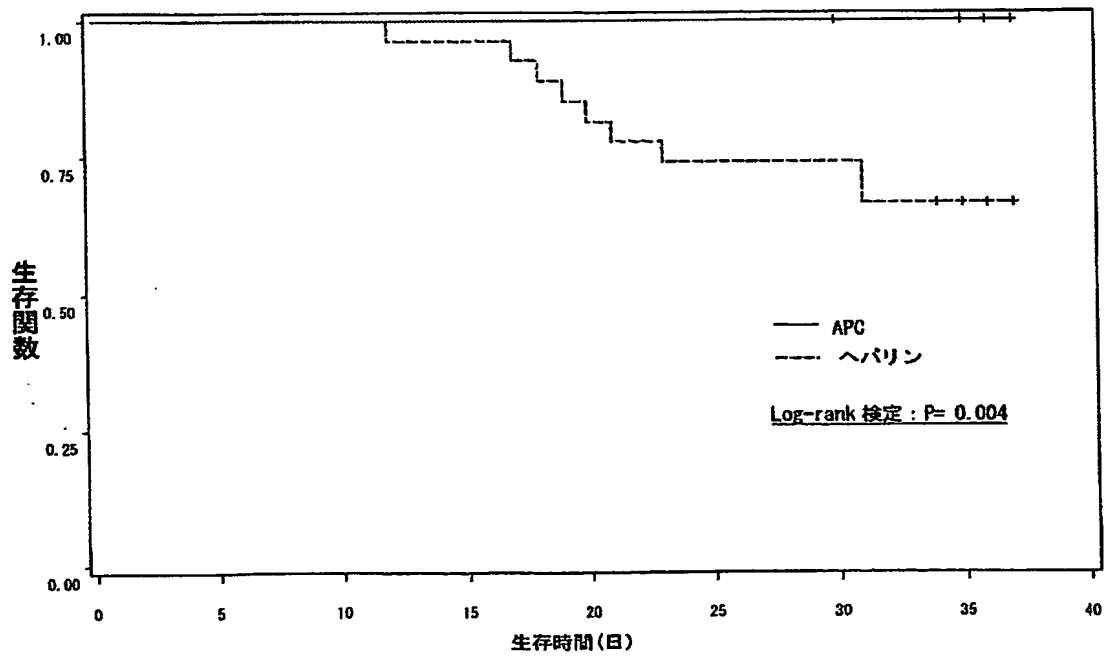
【書類名】

図面

【図 1】



【図 2】



【書類名】 要約書

【要約】

【目的】 悪性腫瘍の治療において、化学療法剤の副作用を軽減し治療効果を高める作用を有し悪性腫瘍患者の生命予後を改善することが期待できる、化学療法補助剤を提供する。

【構成】 血漿由来または遺伝子組換え技術を駆使して調製される活性化プロテインCを主たる有効成分とする、悪性腫瘍治療における化学療法剤の補助剤。

認定・付加情報

特許出願の番号	特願 2003-129208
受付番号	50300753051
書類名	特許願
担当官	第五担当上席 0094
作成日	平成15年 5月 8日

<認定情報・付加情報>

【提出日】	平成15年 5月 7日
-------	-------------

次頁無

特願 2003-129208

出願人履歴情報

識別番号

[000173555]

1. 変更年月日

1996年 3月 4日

[変更理由]

住所変更

住 所

熊本県熊本市大窪一丁目6番1号

氏 名

財団法人化学及血清療法研究所

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☐ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☐ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☐ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☐ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**